

①9 BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 37 17 209 A1**

⑳ Aktenzeichen: P 37 17 209.3
㉔ Anmeldetag: 22. 5. 87
㉕ Offenlegungstag: 1. 12. 88

㉖ Int. Cl. 4:

B01J 20/28

B 01 J 20/10
B 01 J 20/26
B 01 J 20/06
B 01 J 20/24
C 07 K 3/18
C 07 K 17/00
C 07 H 1/06
C 12 N 15/00
// B32B 7/12,
C07H 21/00,
C07K 15/06,
C12Q 1/68,
C12P 19/34

DE 37 17 209 A1

Behörden

㉗ Anmelder:

Diagen Institut für molekularbiologische Diagnostik
GmbH, 4000 Düsseldorf, DE

㉘ Vertreter:

Schönwald, K., Dr.-Ing.; von Kreisler, A.,
Dipl.-Chem.; Fues, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Keller,
J., Dipl.-Chem.; Selting, G., Dipl.-Ing.; Werner, H.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 5000 Köln

㉙ Erfinder:

Colpan, Metin, Dr., 4006 Erkrath, DE; Piotrowiak,
Ralf, Dr., 4010 Hilden, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉚ Mittel zur selektiven Adsorption von Biopolymeren

Es wird ein Mittel beschrieben zur selektiven Adsorption
von Biopolymeren aus einem Gemisch von Biopolymeren an
ein trägegebundenes Material, bestehend aus

- a) einem flächenhaften festen Träger,
- b) einer Klebstoffschicht und
- c) einem Material, das die Biopolymeren adsorbiert, sowie
ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Mit-
tels.

DE 37 17 209 A1

BEST AVAILABLE COPY

1
Patentansprüche

1. Mittel zur selektiven Adsorption von Biopolymeren aus einem Gemisch von Biopolymeren an ein trägergebundenes Material bestehend aus

- a) einem flächenhaften festen Träger
- b) einer Klebstoffschicht und
- c) einem Material, das die Biopolymere adsorbiert

2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der die Klebstoffschicht bildende Klebstoff ein thermoplastischer Klebstoff ist.

3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der flächenhafte feste Träger aus organischem und/oder anorganischem Material besteht.

4. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der flächenhafte feste Träger ein bzw. eine Kunststoffolie, (Eppendorf)-Reaktionsgefäß, Pipettenspitze, Objektträger, Mikrotiterplatte, Kanüle, Nylonfilter und/oder Kunststoffschlauch ist.

5. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das die Biopolymere adsorbierende Material Kieselgel, synthetische organische und anorganische Polymere, Aluminiumoxid, Titanoxid, Agarose, Zellulose, Hydroxylapatit und/oder Acrylamid ist, wobei diese Materialien oberflächlich modifiziert sind.

6. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche des die Biopolymere adsorbierenden Materials durch Ionenaustauschergruppen oder Affinitätsliganden modifiziert ist.

7. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche des die Biopolymere adsorbierenden Materials mit Chelatbildnern modifiziert ist.

8. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß auf einen festen Träger eine Schicht aus thermoplastischem Klebstoff aufgebracht wird, wonach das Material, das die Biopolymere adsorbiert, auf die Klebstoffschicht aufgetragen und bei erhöhter Temperatur behandelt wird.

9. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der feste flächenhafte Träger ein einseitig oder zweiseitig offener Behälter ist und

- a) der Klebstoff in organischen Lösungsmitteln suspendiert aufgebracht,
- b) das Lösungsmittel abdekantiert und nach Verdampfen des restlichen Lösungsmittels
- c) das Adsorbens eingefüllt und dann bei 60 bis 180°C, vorzugsweise 70 bis 120°C behandelt wird.

10. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der flächenhafte Träger eine Folie ist und

- a) der Klebstoff mit einer Roll- oder Schlitzrassel aufgebracht,
- b) mit dem Adsorbens beschichtet und dann
- c) bei 60 bis 180°C, vorzugsweise 70 bis 120°C

2
behandelt wird.

11. Verwendung des Mittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Adsorption, Trennung, Reinigung und/oder Isolierung von Biopolymeren.

12. Verwendung des Mittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur chemischen Modifizierung von Biopolymeren.

13. Verwendung des Mittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das die Biopolymere adsorbierende Material seinerseits ein am festen flächenhaften Träger immobilisiertes Biopolymeres ist, welches zu einem weiteren Biopolymeren eine Affinität besitzt.

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Mittel zur selektiven Adsorption von Biopolymeren aus einem Gemisch von Biopolymeren an ein trägergebundenes Material sowie ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Mittels.

In der molekularbiologischen Laborpraxis, biotechnologischen Verfahrensanwendung und in der medizinischen Diagnostik stellt sich häufig das Problem, daß aus einem Gemisch unterschiedlichster Moleküle eine bestimmte Stoffklasse wie Nukleinsäuren oder Proteine isoliert werden soll. Bekannt sind Verfahren, die sich in ihrem methodischen Aufwand sowie in der erzielbaren Reinheit des isolierten Stoffes beträchtlich unterscheiden. So liefert zum Beispiel die Säulenchromatographie mit Ionenaustauschern in der Regel hochgereinigte Fraktionen. Diese Reinigungsverfahren bedürfen aber eines großen methodischen und apparativen Aufwands (zum Beispiel HPLC-Apparaturen). Ist die Reinigung einer Vielzahl separater Proben notwendig, wie beispielsweise bei der DNS-Analyse rekombinanter Bakterienklone, DNS-Analysen von Gewebeproben in der medizinischen Diagnostik und automatisierte Nukleinsäureisolierung, wird eine derartige Methodik zu aufwendig. Hinzu kommt, daß die mehrmalige Verwendung einer Säule für die Reinigung verschiedener Präparate zu Kontaminationen führt, die gerade im biologisch/medizinischen Bereich höchst unerwünscht sind.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Mittel bereitzustellen, das die einfache Vorbereitung und Weiterverarbeitung von Proben gewährleistet, wobei die Proben Biopolymere, insbesondere Nukleinsäure und/oder Proteine enthalten.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Mittel, bestehend aus

- a) einem flächenhaften festen Träger
- b) einer Klebstoffschicht und
- c) einem Material, das die Biopolymere adsorbiert.

Der Klebstoff fixiert das die Biopolymere adsorbierende Material (Adsorbentien) auf flächigen Trägermaterialien. Die Fixierung der Adsorbentien erfolgt durch einen Klebstoff, vorzugsweise einen Schmelzkleber auf der Basis von Polypropylen und Polybutylen, welcher vorher auf die entsprechende Oberfläche aufgebracht wird. Als besonders geeignet haben sich thermoplastische Klebstoffe, zum Beispiel Vestoplast-508 (ein alpha-Olefin-Copolymer der Hüls AG), erwiesen, da sie technisch leicht zu verarbeiten sind, die Fixierung in chemischer Hinsicht unterschiedlichster Partikel gestatten und aufgrund der Unlöslichkeit in wäßrigen Lösungen

BEST AVAILABLE COPY

nicht zu Kontaminationen der Probe führen. Die erfindungsgemäß eingesetzten Klebstoffe können durch Erhitzen verflüssigt werden und entwickeln erst dann ihre klebenden Eigenschaften. Die Temperatur der Thermobehandlung des Klebstoffes liegt zwischen 60 und 180°C, vorzugsweise bei 70 bis 120°C. Der Klebstoff wird zum Auftragen auf den festen flächenhaften Träger in Form eines einseitig oder zweiseitig offenen Behälters (Reaktionsgefäß, Schlauch und ähnliches) zunächst in Chloroform oder Methylenchlorid gelöst oder suspendiert (0,05 bis 0,5 g/ml, vorzugsweise 0,1 bis 0,3 g/ml Chloroform oder Methylenchlorid). Danach gibt man diese Suspension in das Gefäß. Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Klebstoff und Gefäßwand wird die Gefäßwandung mit Klebstoff beschichtet. Dann dekantiert man die überschüssige Suspension ab.

Die jeweiligen Adsorbentien werden aufgetragen; im einfachsten Fall durch Bestreuen der Gefäßwand, und bei einer Temperatur von 60 bis 180°C, vorzugsweise 70 bis 120°C prozessiert, so daß die Adsorbentien mittels Klebstoff an der Gefäßwand haften. Dabei ist es gleichgültig, aus welchem Material das Adsorbens besteht. Es können sowohl oberflächenmodifizierte Materialien auf der Basis von Kieselgel, Aluminiumoxid, Titanoxid, Agarose, Cellulose, Hydroxylapatit, Acrylamid und andere unlösliche Adsorbentien eingesetzt werden. Die Art der Oberflächenmodifizierung spielt dabei ebenfalls keine Rolle; Ionenaustauschergruppen enthaltende Adsorbentien können ebenso verwendet werden wie beispielsweise Affinitätsadsorbentien oder Chelatbildner.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren fixierten Adsorbentien stellen eine grundsätzlich neue Anwendungsform dar und bieten die Möglichkeit neuer und im Vergleich zur üblichen Methodik einfacherer Verfahren. Das fixierte adsorbierende Material wird lediglich mit einer die zu trennenden Substanzen enthaltenden Lösung überschichtet und eine bestimmte Zeit inkubiert. In Abhängigkeit von den Lösungsbedingungen binden bestimmte Moleküle aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen reversibel an chemische Gruppen des Adsorbens. Nach der Bindung wird die verbliebene Lösung dekantiert. In einem Waschvorgang wird durch erneutes Überschichten und Dekantieren das Adsorbens von unspezifisch gebundenen und abzutrennenden Substanzen gereinigt. In einem abschließenden Elutionsschritt wird eine Lösung zugesetzt, die zur Freisetzung der gebundenen Moleküle führt.

Als Adsorbentien kommen Materialien wie synthetische, organische und anorganische Polymere, Kieselgel, Aluminiumoxid, Titanoxid, Cellulose, Agarose, Hydroxylapatit, Acrylamid und andere unlösliche Adsorbentien in Betracht, wobei diese Materialien meist oberflächlich modifiziert sind. Vorzugsweise kann die Modifikation aus chemischen Gruppen bestehen, die Ionenaustauschergruppen aufweisen oder die Möglichkeit zur Immobilisierung von Affinitätsliganden besitzen oder bereits mit Affinitätsliganden beladene Adsorbentien sind. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Oberfläche des Trägermaterials mit Chelatbildnern modifiziert. Auch sogenannte "reversed phase"-Materialien können für bestimmte Applikationen wie Entfernung von hydrophoben Bestandteilen eines Gemisches verwendet werden. Besonders bevorzugt sind Adsorbentien, die bekannt sind aus DE-OS 32 11 309 sowie in der deutschen Patentanmeldung der Anmelderin P 36 27 063 vorgeschlagen werden. Die Partikelgröße beträgt 1 µm bis 2 mm. Die Porengröße beträgt 5,0 bis

2500 nm, vorzugsweise 150 nm. Das in Form von Partikeln vorliegende, oberflächlich modifizierte Adsorbens wird, wie oben beschrieben, mittels eines thermoplastischen Klebstoffs an den flächenhaften festen Träger gebunden, der aus organischem und/oder anorganischem Material besteht. Der flächenhafte Träger kann in bevorzugten Ausführungsformen bestehen aus Folien, Filtern, Schläuchen, Gefäßen oder Platten aus Kunststoffen, Glas, Keramik etc. Weitere bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Mittels sind Arbeitsgerätschaften wie Reaktionsgefäße aus Kunststoff (Eppendorf-Gefäß), Pipettenspitzen, Objektträger, Mikrotiterplatten, Kanülen, Nylonfilter und ähnliches.

Der Anwendungsbereich des erfindungsgemäßen Verfahrens ist außerordentlich breit. Beispielhaft seien genannt: Plasmidpräparationen, Isolierung langkettiger, chromosomaler DNS aus unterschiedlichsten Quellen, Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren unterschiedlichster Provenienz sowie Immobilisierung von Proteinen, insbesondere Immunglobulinen sowie Reinigung von spezifischen Antigenen durch Affinitätsadsorption. Außerdem ist es möglich, das erfindungsgemäße Mittel zur adsorptiven Immobilisierung von Biopolymeren zu verwenden, um diese einer chemischen Modifizierungsreaktion zu unterziehen. So können beispielsweise Nukleinsäuren in adsorbiertem Zustand mit Enzymen, beispielsweise Restriktionsenzymen behandelt werden. Auch eine Behandlung mit Polymerasen sowie radioaktive Markierung mittels Nicktranslationen, Endmarkierungen mit Klenow-Polymerasen, Methylierungen, Phosphatasebehandlungen und ähnlichen Reaktionen der Nukleinsäurebiochemie sind mit dem erfindungsgemäßen Mittel in überraschend einfacher Weise möglich. Das Verfahren ist Gegenstand einer gleichzeitig mit dieser Patentanmeldung eingereichten Patentanmeldung.

Es ist auch möglich, zuerst ein Biopolymer, das eine gewisse Affinität zu anderen Biopolymeren aufweist, an dem betreffenden Adsorbens zu immobilisieren, wonach dann das eigentlich zu untersuchende oder gewinnende Biopolymere in Form eines Sekundärkomplexes an den primären Komplex gebunden wird. So weist zum Beispiel Protein A eine starke Affinität zu Immunglobulinen (IgG) auf. Immobilisiert man also Protein A an dem Biopolymere adsorbierenden Material, wird man in die Lage versetzt, die IgG-Fraktion aus einer Probe selektiv zu adsorbieren.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Die Kopplung der Partikel an den festen flächenhaften Träger erfolgt mit Vestoplast-508, einem alpha-Olefin-Copolymer der Hüls AG.

Um das Reaktionsgefäß mit einer einheitlich dicken Schicht von etwa 20 µm mit dem Klebstoff zu beschichten, wird zunächst Vestoplast-508 in Chloroform suspendiert (0,15 g/ml), so daß eine kolloidale Suspension entsteht. Diese Klebstoffsuspension wird in das Reaktionsgefäß gegeben und sofort wieder dekantiert. Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen dem Material des entsprechenden festen flächenhaften Trägers und dem Klebstoff verbleibt ein dünner Film an der Innenwandung des Gefäßes. Durch Unterdruck (5 Minuten im Exsikkator) wird anschließend das Chloroform entfernt. Die zu fixierenden Partikel, zum Beispiel Anionenaustauscher wie Fractogel TSK DEAE-650, Ionenaustau-

sch, vorgeschlagen in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3 und bekannt aus DE-OS 32 11 309, mit Partikelgrößen von 50 bis 1000 µm und Durchmesser der Poren mit dem 1- bis 20-fachen des Durchmessers des zu trennenden Moleküls, werden in das Gefäß gefüllt, welches anschließend auf ca. 74°C erhitzt wird und dabei seine klebenden Eigenschaften entwickelt. Nach dem Abkühlen werden nicht fixierte Partikel mittels Druckluft durch Wegblasen entfernt.

Beispiel 2

Mit Vestoplast-508 kompatible Folien können direkt beschichtet werden, indem der thermisch verflüssigte Klebstoff aufgetragen wird und mittels einer Roll- oder Schlitzraker ein homogener Film der jeweils gewünschten Schichtdicke aufgezogen wird. Die Fixierung erfolgt auch in diesem Fall durch Erwärmung des Klebers in Gegenwart der Partikel.

Beispiel 3

Kanülen und Pipettierspitzen werden beschichtet, indem die Klebstoffsuspension eingezogen, sofort wieder herausgedrückt und nach Einfüllen der jeweiligen Partikel, zum Beispiel gemäß der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3, DE-OS 32 11 309 oder anderer Ionenaustauscher erhitzt wird. Ungebundene Partikel werden mittels Druckluft durch Wegblasen entfernt.

Gemäß den Beispielen 1 bis 3 können die folgenden Materialien zur Herstellung des erfindungsgemäßen Mittels eingesetzt werden: Ionenaustauscher auf Silica-gel-/Agarose-/Acrylamid-/Cellulose-Basis, wie DE-52 und TSK DEAE-650 (Merck Katalog Nr. 14989; das Material muß mit Wasser und Aceton vorher gewaschen und im Vakuum getrocknet werden) sowie handelsübliche Reversed-phase-Materialien, zum Beispiel Merck Lichroprep RP-18, Katalog-Nr. 13 900 sowie aktivierte Affinitätsadsorbentien, wie zum Beispiel Eupergit-C (Roehm-Pharma).

Beispiel 4

Plasmidpräparation aus Escherichia coli mit Hilfe von mit Ionenaustauscher beschichteten Eppendorf-Reaktionsgefäßen nach Beispiel 1, wobei das in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3 vorgeschlagene Ionenaustauschermaterial verwendet wird:

Der Bakterienaufschluß erfolgt nach der Alkaline Lysis Method (siehe Maniatis et al. 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-136-0, New York). Anstelle der Phenolisierung wird jedoch der Überstand auf 1 M Natriumchlorid und 50 mM Natriumacetat pH 7 eingestellt und in ein Reaktionsgefäß gegeben, wobei das Reaktionsgefäß gemäß Beispielen 1 bis 3 mit dem Ionenaustauscher bekannt aus der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3 beschichtet wurde.

Nach 15 Minuten wird die Lösung dekantiert, das Reaktionsgefäß mit 2 × je 1 ml der angegebenen Pufferlösung gewaschen und dann 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 × 100 µl Elutionspuffer (1,5 M Natriumchlorid, 50 mM Natrium-Acetat pH 7, 15% Ethanol) eluiert. Das Eluat wird mit 25 µl Wasser und 80 µl Isopropanol versetzt, 20 Minuten bei -70°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die so isolierte Plasmid-DNS ist in der Reinheit mit durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie gereinigten DNS-Proben vergleichbar. Sie kann erfolgreich enzymatischen Behand-

lungen unterworfen werden.

Beispiel 5

Isolierung langkettiger, chromosomaler DNS aus Gewebe mit Hilfe von mit Ionenaustauschern beschichteten Eppendorf-Reaktionsgefäßen nach Beispiel 1, wobei der Ionenaustauscher in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3 vorgeschlagen wird:

Für den Zellaufschluß eukaryotischer Zellen existieren verschiedene Methoden (vgl. Maniatis et al. 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-136-0, New York). Sobald die Zellen lysiert sind, wird das von störenden Bestandteilen befreite Lysat (cleared lysate) auf 1 M Natriumchlorid und 50 mM Natriumacetat pH 7 eingestellt und anschließend, wie in Beispiel 4 beschrieben, behandelt. Es können auf diese Weise extrem große DNS-Fragmente (50 bis 1000 kb) isoliert werden. Bei allen anderen Methoden, die zur Reinigung und Isolierung von DNS bekannt sind, wie Säulenchromatographie und phenolischer Aufschluß, kommt es aufgrund starker Scherkräfte zur Fragmentierung der Nukleinsäuren. Werden die nach Beispiel 1 hergestellten erfindungsgemäßen Mittel eingesetzt, unterliegen die Moleküle nur schwachen Diffusionskräften und nur geringfügigen Scherkräften.

Darüber hinaus bewirkt die rein oberflächliche Adsorption eine zusätzliche Stabilisierung der langen Moleküle, deren Länge 1 µm bis 3000 µm betragen kann.

Beispiel 6

Isolierung von Nukleinsäuren (BNYV-Virus) aus stark verschmutzten Quellen, zum Beispiel Erde, mit Hilfe von mit Ionenaustauscher beschichteten 50 ml-Falcon-Reaktionsgefäßen, wobei die Reaktionsgefäße nach Beispiel 1 mit Ionenaustauscher, der in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3 vorgeschlagen wird, wie folgt durchgeführt wird:

Etwa 10 g Erde werden mit 10 ml 40 mM TRIS-Puffer, pH 7,5, 20 mM Natrium-Acetat und 1 mM EDTA sowie mit 10 ml wasser-gesättigtem Phenol versetzt und 2 Minuten mit Ultraschall behandelt. Anschließend werden 800 µl 25%iges Triton X-100 und 10 ml Chloroform zugesetzt und nach Mischen 10 Minuten bei 3500 g zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wird mit 10 ml Chloroform versetzt und erneut 10 Minuten bei 3500 g zentrifugiert. Die wäßrige Phase wird nun auf 300 mM Natriumchlorid eingestellt und in die beschichteten Reaktionsgefäße gegeben. Die Bindung von Nukleinsäuren erfolgt während 40 Minuten bei 40°C. Anschließend wird der Überstand dekantiert und verworfen und das Reaktionsgefäß 2 × mit wassergesättigtem Phenol und 2 × mit 50 ml 0,3 M Natriumchlorid gewaschen. Die Elution erfolgt 10 Minuten bei 1,5 M Natriumchlorid, 50 mM Natrium-Acetat pH 7 und 15% Ethanol. Das Eluat wird durch 1 Vol. Wasser und 20 ml Isopropanol 30 Minuten bei -20°C gefällt und abzentrifugiert. Darauf folgende Gelelektrophorese und DOT-BLOT-Analysen belegen eine wesentlich höhere Probenreinheit als es mit anderen Verfahren, wie zum Beispiel der Säulenchromatographie, erreichbar ist.

Beispiel 7

Immobilisierung von Protein A und Reinigung von Human Immunglobulinen (IgG) mit Protein A-Affinitätsadsorption:

Ein mit aktiviertem Silicagel beschichtetes Eppendorf-Reaktionsgefäß wird mit 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, gefüllt und 1 mg Protein A (aus *Staphylococcus aureus* oder rekombinantes Protein A) gelöst in 100 µl 0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 8,0, zugegeben. Die Suspension wird 4 Stunden bei 4°C geschüttelt, um eine hohe Immobilisierung von Protein A zu gewährleisten. Nach der Reaktion wird das nicht immobilisierte Protein A pipettiert und das Eppendorf-Reaktionsgefäß 2 × mit je 500 µl 0,1 molar Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, gewaschen. Die nicht reagierten aktiven Gruppen werden blockiert durch zweistündiges Schütteln mit 250 µl 0,05 M Mercaptoethanol in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0. Nach der Blockierungsreaktion wird das Produkt 5 × mit 500 µl 0,1 molar Natriumphosphatpuffer pH 7,0 gewaschen. Das mit Protein A beschichtete Eppendorf-Reaktionsgefäß wird mit 1 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, und 1 ml 0,05 M Natriumcitratpuffer, pH 3,0, gewaschen und 2 × mit 1 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, äquilibriert. Die IgG-Probe, bestehend aus 1 mg rohem human IgG, wird in 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, gelöst, in das mit Protein A beschichtete Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und 30 Minuten bei 10°C geschüttelt und adsorbiert. Verunreinigungen mit anderen Proteinen und unspezifisch gebundenes IgG werden durch dreimaliges Waschen mit 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, ausgewaschen und das spezifisch gebundene human IgG mit 2 × 100 µl 0,05 M Citratpuffer, pH 3,0, eluiert.

Die Bindekapazität von mit Protein A beschichteten Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde zu je 200 µg IgG bestimmt.

Beispiel 8

Immobilisierung von Maus anti-human IgG und Reinigung von Human Immunglobulinen (IgG) mit Maus anti-human IgG-Affinitätsadsorption:

Ein mit aktiviertem Silicagel beschichtetes Eppendorf-Reaktionsgefäß wird mit 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, gefüllt und 1 mg Maus anti-human IgG gelöst in 100 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, zugegeben. Die Suspension wird 4 Stunden bei 4°C geschüttelt, um einen hohen Immobilisierungsgrad von Maus anti-human IgG zu gewährleisten. Nach der Reaktion wird das nicht immobilisierte Maus anti-human IgG pipettiert und das Eppendorf-Reaktionsgefäß 2 × mit je 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, gewaschen. Die nicht abreagierten, aktiven Gruppen werden blockiert durch zweistündiges Schütteln mit 250 µl 0,05 M Mercaptoethanol in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0. Nach der Blockierungsreaktion wird das Produkt 5 × mit 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, gewaschen. Das mit Maus anti-human IgG beschichtete Eppendorf-Reaktionsgefäß wird mit 1 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 und 1 ml 0,05 M Natriumcitratpuffer, pH 3,0, gewaschen und 2 × mit je 1 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, äquilibriert. Die IgG-Probe, bestehend aus 1 mg rohem human IgG, wurde in 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, gelöst, in das mit Maus anti-human IgG beschichtete Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und 30 Minuten bei 4°C geschüttelt und adsorbiert.

Verunreinigungen mit anderen Proteinen und unspezifisch gebundenes IgG werden durch dreimaliges Waschen mit je 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, ausgewaschen und das spezifisch gebundene human

IgG mit 2 × je 100 µl 0,05 M Citratpuffer, pH 3,0, eluiert. Die Bindekapazität von einem mit Maus anti-human IgG beschichteten Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde zu 50 µg IgG bestimmt.

Beispiel 9

Nukleinsäuren können in adsorbiertem Zustand, insbesondere gebunden an Ionenaustauscher, vorgeschlagen in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3 der Anmelderin, Fractogel TSK DEAE-650 und DE-52 Cellulose, nach den bekannten Verfahrenswegen (siehe Maniatis et al. 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN-0-87969-136-0, New York) enzymatisch behandelt werden. Vor Zugabe des Enzyms empfiehlt sich die Zugabe von Rinderserumalbumin (BSA). 3 µg Plasmid, zum Beispiel pBR 322, die nach der oben beschriebenen Plasmidpräparationsmethodik isoliert worden sind und an einen Anionenaustauscher wie DE-52 Cellulose gebunden sind, werden mit Eco R 1 endonukleolytisch gespalten. Hierzu wird zunächst eine Rinderserumalbumin-Lösung (2 mg/ml Eco R I Puffer) in das Reaktionsgefäß gegeben. Nach 10 Minuten wird diese Lösung dekantiert und verworfen. Mit 3 Einheiten Eco R I wird nun 30 Minuten in 100 mM Natriumchlorid, 50 mM TRIS, pH 7,5, 10 mM Magnesiumchlorid und 1 mM Dithiothreitol verdaut. Etwa 90 bis 95% der gesamten Plasmid-Spaltstellen ist umgesetzt, wie sich nach Elution mit anschließender Gelelektrophorese nachweisen läßt.

- Leerseite -

BEST AVAILABLE COPY